

Rec'd PCT/PTO 08 MAR 2005

PCT/PTO 03/01851 #2

RO/KR 16.10.2003



This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0055106
Application Number

출원년월일 : 2002년 09월 11일
Date of Application
SEP 11, 2002

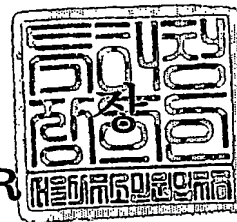
출원인 : 에스케이케미칼주식회사
Applicant(s)
SK CHEMICALS. CO., LTD.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 09 월 26 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2002.09.11
【발명의 명칭】 인동등으로부터 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법 및 그 추출물을 함유한 주사제 조성물
【발명의 영문명칭】 Extraction and purification method of constituents from stem of Lonicera japonica Thunb. and the constituents of injection drug
【출원인】
【명칭】 에스케이케미칼 주식회사
【출원인코드】 1-1998-002067-1
【대리인】
【성명】 허상훈
【대리인코드】 9-1998-000602-6
【포괄위임등록번호】 2002-035634-7
【발명자】
【성명의 국문표기】 광의종
【성명의 영문표기】 KWAK, Wie-Jong
【주민등록번호】 550302-1029513
【우편번호】 137-044
【주소】 서울특별시 서초구 반포4동 한신서래아파트 3동 803호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 조용백
【성명의 영문표기】 CH0, Yong-Baik
【주민등록번호】 601110-1019621
【우편번호】 431-070
【주소】 경기도 안양시 동안구 평촌동 932-6 꿈마을아파트 101-1105
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 한창균
【성명의 영문표기】 HAN, Chang-Kyun

【주민등록번호】	630519-1052618
【우편번호】	153-014
【주소】	서울특별시 금천구 독산4동 1019-28
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신희재
【성명의 영문표기】	SHIN,Hee Jae
【주민등록번호】	670109-1928114
【우편번호】	440-829
【주소】	경기도 수원시 장안구 율전동 518번지 상호진덕아파트 206-601
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	류근호
【성명의 영문표기】	RYU,Keun Ho
【주민등록번호】	670508-1357119
【우편번호】	137-130
【주소】	서울특별시 서포구 양재2동 208-1 화평빌라 A동 201호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유헌승
【성명의 영문표기】	YOO,Hunseung
【주민등록번호】	751212-1052321
【우편번호】	157-032
【주소】	서울특별시 강서구 등촌2동 태진아름아파트 101동 603호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이해인
【성명의 영문표기】	RHEE,Hae In
【주민등록번호】	720524-1037210
【우편번호】	151-012
【주소】	서울특별시 관악구 신림2동 95-74 21/2
【국적】	KR
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 허상훈 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
---------	----	---	--------	---

【가산출원료】	4	면	4,000	원
---------	---	---	-------	---

【우선권주장료】	0	건	0	원
----------	---	---	---	---

【심사청구료】	0	항	0	원
---------	---	---	---	---

【합계】	33,000	원		
------	--------	---	--	--

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 인동등(인동잎을 제거한 인동줄기, 이하 인동등)으로부터 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법 및 그 유효활성성분을 함유한 주사제 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인동등으로부터 불필요한 탄닌과 난용성 플라보노이드, 사포닌 등의 성분을 제거하여 주사제 원료로 사용시 약효가 우수하며 그 유효성, 안전성 및 안정성이 뛰어난 스웨로사이드(sweroside), 로가닌(loganin)과 같은 이리도이드(iridoid)계 물질을 주성분으로 함유한 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법 및 그 유효활성성분을 함유한 소염, 진통 주사제 조성물에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

인동등, 스웨로사이드(sweroside), 로가닌(loganin), 주사제

【명세서】**【발명의 명칭】**

인동등으로부터 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법 및 그 추출물을 함유한 주사제 조성물{Extraction and purification method of constituents from stem of *Lonicera japonica* Thunb. and the constituents of injection drug}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 최종정제물의 유효활성성분의 함량별 약효 그래프를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<2> 본 발명은 인동등(인동잎을 제거한 인동줄기, 이하 인동등)으로부터 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법 및 그 유효활성성분을 함유한 주사제 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인동등으로부터 불필요한 탄닌과 난용성 플라보노이드, 사포닌 등의 성분을 제거하여 주사제 원료로 사용시 약효가 우수하며 그 유효성, 안전성 및 안정성이 뛰어난 스웨로사이드(sweroside), 로가닌(loganin)과 같은 이리도이드(iridoid)계 물질을 주성분으로 함유한 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법 및 그 유효활성성분을 함유한 소염, 진통 주사제 조성물에 관한 것이다.

<3> 인동(忍冬, *Lonicera japonica* Thunb.)은 일본·중국 및 우리나라의 전국 각처의 산야지 해발 50 ~ 600 m 지역 산기슭 및 인가부근 독에 자생하는 반상록(半常綠) 덩굴성 관목으로서 꽃봉우리는 금은화(金銀花), 줄기와 가지는 인동등(忍冬藤)이라 하여 이뇨, 해독, 종기, 부종(浮腫), 감기, 지혈(止血), 정혈(淨血), 하리(下痢), 구토(嘔吐)등에 사용되고 있는 생약이다[대한식물도감, 이창복, 709, 1989, 향문사, 서울 ; 대한약전외한약(생약)규격집, 지형준, 이상인, 87, 305, 1988, 한국메디칼인텍스사, 서울 ; 한국의자원식물, 김태정, vol. 4, 148-149, 1996, 서울대학교출판부, 서울]. 또한, 사상의학, 광제비급 등의 한의서에 인체내외의 각종 염증성 질환인 용저(癰疽)에 유용하게 사용된다는 기록이 있으며 [조선민족 사상의학, 연변 조선민족의약연구소, 276, 1991, 여강출판사, 서울 ; 광제비급, 이경화, 349-351, 1991, 여강출판사, 서울], 민간에서는 오래 전부터 소염, 진통 활성이 알려져 감기와 같은 상기도 감염증, 편도선염 및 신경통 치료에 많이 사용되어왔다. 최근 인동의 이러한 소염, 진통 활성이 여러 실험동물 모델을 통하여 과학적으로 입증되었고, 유효 생리 활성 물질들도 분리되어 학계에 보고되었다[식물성 항염증제의 개발 : 인동추출물에 대한 항염증 및 진통작용의 비교, 이송진 외, 생약학회지, 363-367, 25, 1994 ; Flavonoids from the aerial parts of *Lonicera japonica*, Son et al., Arch. Pharm. Res., 365-370, 15, 1992 ; Antiinflammatory activity of *Lonicera japonica*, Lee et al., Phytother. Res., 445-447, 12, 1998 ; Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Lonicera japonica*, Son et al., Phytochem., 1005-1008, 35, 1994 ; Anti-inflammatory activity of the major constituents of *Lonicera japonica*, Lee et al., Arch. Pharm. Res., 133-135, 18, 1995].

<4> 지금까지 알려진 인동등에 함유된 유효활성성분으로 카페오일퀴닌산(caffeoylquinic acid), 메틸 카페이트(methyl caffeate), 클로로제닌산(chlorogenic acid), 아이소-클로로제

닌산(iso-chlorogenic acid) 등의 가수분해형 탄닌(tannin)류와 로가닌(loganin), 스웨로사이드(sweroside), 보겔로사이드(vogeloside), 에피-보겔로사이드(epi-vogeloside) 등의 이리도이드(irisoid glycosides) 등이 알려져 있다. 기존 문헌에는 대부분 인동 꽃 봉오리인 금은화와 인동잎의 성분 연구가 대부분이었다. 그러나, 주시할 점은 인동등과 인동잎, 금은화는 함유 성분계열의 분포가 다르다는 점이다. 즉, 인동등과는 달리 인동잎이나 금은화에는 로니세린(lonicerin), 로이폴린(rhoifolin), 오크나플라본(ochnaflavon) 등의 플라보노이드(flavonoid)나 헤데라제닌(hederagenin), 올레아놀린산(oleanolic acid)을 비당부로 갖는 트라이테펜(triterpene)계 사포닌(saponin) 및 각종 가수분해형 탄닌류가 주를 이루고 있다.

- ◁ 그러나, 이러한 계열의 성분을 갖는 인동으로부터 주사제를 개발하기에는 몇 가지 문제점이 있다. 즉, 주사제 원료 내에 고분자 탄닌류가 다량 함유되어 있으면 시간이 경과함에 따라 여타 다른 성분들과 결합해 공침 현상이 발생할 우려가 있고 체내에 투여 시 혈액내 혈장 단백질과 결합하여 난용성 침전을 형성, 혈관폐색증을 야기할 수도 있다. 그리고, 인동에 함유되어 있는 플라보노이드는 일반적으로 물에 상당히 난용성이기 때문에 일정량 이상의 유기용매나 기타 용해 보조제를 쓰지 않으면 유효 농도 이상으로 녹이기 힘든 문제점이 있고, 또한 플라보노이드의 함량이 높은 분획물은 일반적으로 주사용 생리 식염수에 난용성이고 알칼리 버퍼에 장기 보존 시 그 안정성이 문제가 될 우려가 있다. 마지막으로 인동 유래 사포닌, 특히 모노데스모사이드(monodesmoside)류는 용혈작용이 강한 것으로 알려져 있기 때문에 이를 정제하지 않고 직접 정맥 주사하는 것은 불가능하다 [Studies on the saponins of *Lonicera japonica* Thunb., Kawai et al., Chem. Pharm. Bull., 4769-4775, 36(12), 1988].
- 특히, 인동잎이나 금은화는 탄닌과 난용성 플라보노이드의 함량이 인동등에 비해 월등히 높아

주사제로 사용시 급성 독성 시험에서 인동등에 비해 저용량에서도 독성을 야기시켰을 뿐 아니라, 진통, 소염과 관련된 유효성 또한 좋지 않았다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <6> 이에, 본 발명자들은 소염, 진통 효과가 우수하며 안전성 및 안정성이 뛰어난 분획을 정제하여 주사제를 제조하기 위해 연구를 수행한 결과, 인동등으로부터 불필요한 탄닌과 난용성 플라보노이드, 사포닌 등의 성분을 제거하여 약효 성분의 함량이 매우 높으며 안전성 및 안정성이 뛰어나 주사제 원료로 적합한 스웨로사이드(sweroside), 로가닌(loganin)과 같은 이리도이드(iridoid)계 물질을 주성분으로 함유한 유효활성성분을 추출, 정제하고 이 물질이 기존 추출물에 비해 소염, 진통 효과가 월등히 우수함을 밝힘으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- <7> 따라서, 본 발명은 인동등으로부터 소염, 진통활성이 우수하며, 안전성 및 안정성이 우수한 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- <8> 또한, 본 발명은 인동등으로부터 얻은 소염, 진통활성이 우수하며, 안전성 및 안정성이 우수한 유효활성성분을 함유한 진통, 소염 주사제 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <9> 본 발명은 인동등을 물로 환류 추출한 후에 여과하고, 이 여액에 동량의 수포화 저급 알코올을 넣어 층 분리한 후 수포화 저급 알코올층을 감압농축하여 분말 엑기스를 얻고, 이 엑기스에 폴리아미드 레진 또는 폴리비닐피롤리돈 레진으로 정제 후 옥타데실실란 레진을 사용하여

정제하는, 인동등으로부터 소염, 진통작용이 우수하며 안전성 및 안정성이 우수한 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법을 그 특징으로 한다.

- <10> 또한, 상기 유효활성성분을 함유하며 안전성 및 안정성이 우수한 진통, 소염 주사제 조성물을 포함한다.
- <11> 이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <12> 본 발명은 인동등으로부터 불필요한 탄닌과 난용성 플라보노이드, 사포닌 등의 성분이 제거되어 주사제 원료로 사용시 약효가 우수하며 안전성 및 안정성이 뛰어난 스웨로사이드(sweroside), 로가닌(loganin)과 같은 이리도이드(iridoid)계 물질을 주성분으로 함유한 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법 및 그 유효활성성분을 함유한 주사제 조성물에 관한 것이다.
- <13> 먼저 기존에 사용했던 인동전초(인동등과 인동잎이 혼재된 전초 상태, 이하 인동전초), 인동잎 및 본 발명에서 사용된 인동등을 다음과 같이 추출, 정제한다.
- <14> 인동전초, 인동잎, 인동등 각각의 시료를 생약 중량 대비 약 7 ~ 10 배량의 증류수로 2 시간 내지 3시간동안 환류 추출한 후 여과하여 여액을 모으고, 다시 5 ~ 7 배량의 증류수로 2 시간 내지 3시간동안 환류 추출한 후 모은 액을 여과하여 앞의 여액과 합친 뒤 감압농축하여 그 부피가 원 생약 중량 대비 약 1 ~ 3배량 (v/w) 정도가 되도록 한 후 다시 한번 여과한다. 증류수로 추출함에 있어 물의 양이 너무 적어지게 되면 교반이 어렵게 되고 추출물의 용해도가 낮아져 추출 효율이 떨어지게 되며, 증류수의 양이 너무 많아지면 추출 효율 대비 농축할 증류수의 양이 많아져 시간과 경제적 불합리성이 발생하게 되므로 위와 같은 공정으로 진행한다. 그 후 동량의 수포화 저급 알코올을 넣어 약 10 ~ 20 분간 30 ~ 50 rpm 정도로 교반하고 정제시켜, 층을 분리한 뒤 수포화 저급 알코올 층을 여과, 감압 농축하여 1차 활성 정제 분획을

얻는다. 이때 사용되는 수포화 저급 알코올은 저급 알코올의 포화수용액으로서 저급 알코올에 증류수를 가하고 교반시킨 후 정제시켜 증류수로 포화된 저급 알코올 층을 취한 것으로 예를 들면, 프로필알코올, 부틸알코올 등이 사용가능하며 층분리는 2 ~ 3회 실시한다. 만일 저급 알코올 용매 분획을 얻음에 있어 소량의 저급 알코올을 사용하게 되면 정제 효율이 떨어져 엑기스의 수율 및 유효성분의 함량이 낮아지고, 과량의 저급 알코올을 사용하게 되면 정제 효율 대비 과다한 알코올 사용으로 경제성을 떨어뜨리게 된다. 따라서, 원생약 중량의 1 ~ 3 배량 (v/w)의 저급 알코올을 사용하는 것이 좋은데 상기에 기술된 양은 이 같은 정제 효율 및 경제성에 부합된다.

- 15> 상기의 방법대로 제조된 인동전초와 인동등, 인동잎 활성분획을 각각 주사제 형태로 제조하여 활성을 검색한 결과 인동등의 활성분획이 진통 및 소염 효과가 가장 우수하였다. 또한, 각각의 분획물에 대해 급성 독성 시험 및 혈액 안전성 시험을 한 결과 역시 인동등 활성분획물이 가장 안전하다는 결론을 내리게 되었다. 특히, 인동잎 분획물은 혈액안전성 및 용해도, 급성 독성 시험 모두에서 주사제로 개발하기에는 부적절한 결과를 보였으며, 이는 인동잎에 다량 함유된 난용성 플라보노이드(flavonoid), 탄닌(tannin) 및 사포닌(saponin) 성분들에 기인한 결과였다. 따라서, 이러한 불필요한 물질의 제거와 약효물질 탐색을 위해 먼저 폴리아미드 레진 또는 폴리비닐피롤리돈 레진 등을 이용하여 인동전초, 인동등, 인동잎 활성분획물에 대한 컬럼 크로마토그래피를 실시하는데, 이때 사용된 상기 충전제의 양은 수포화 저급 알코올층의 1 ~ 10 배량(w/w)을 사용하고 용매는 증류수, 50% (v/v) 메탄올 수용액, 메탄올 순서로 충전제 부피의 2 ~ 3배량을 용출시킨 후 다음 용매를 용출시키는 스텝-그라디언트(step-gradient) 방식을 사용한다. 이렇게 얻어진 분획물 중 증류수로 용출시켰을 때 얻어진 분획물은 방향족 유기산, 탄닌, 플라보노이드류 화합물들이 상당히 제거되었을 뿐만 아니

라 약효증가, 현격한 급성 독성 감소, 용해도 증가, 혈액 안전성 증가 등의 뛰어난 개선 효과를 보였다. 이 분획물에 대하여 다시 ODS(Octadecylsilane) 레진을 이용해 컬럼 크로마토그래피를 실시하는데 10%(v/v) 메탄올 수용액부터 10%(V/V)씩 메탄올 양을 늘려가며 레진 부피의 2 ~ 3배량의 용매를 스텝-그라디언트 방식으로 용출시키고 레진의 양은 상기의 폴리아미드 레진 또는 폴리비닐피롤리돈 레진 등을 이용하여 정제된 증류수 용출분획 중량의 10 ~ 20배 중량을 사용한다. 이때, 20 ~ 30%(v/v) 메탄올 수용액을 용출시킨 분획이 가장 약효가 우수하며, 안전하여 주사제 형태로의 개발에 적합한 것으로 판단되었다.

16> 상기와 같은 본 발명에 따른 방법으로 인동등으로부터 추출되어 규격화된 분획물, 특히 가장 활성이 좋았던 20 ~ 30%(v/v) 메탄올 수용액 용출 분획의 소염, 진통 유효활성성분을 추적한 결과 스웨로사이드(sweroside), 로가닌(loganin)과 같은 이리도이드(iridoid)계 물질이 주 활성 물질이며, 이때 스웨로사이드의 함량은 15.1 ~ 72.1 중량%, 로가닌(loganin)의 함량은 13.9 ~ 41.4 중량%로 확인되었다. 동물 실험에서의 ED₅₀는 진통효과 측정을 위한 아세트산유도 라이딩 시험에서 0.03 mg/Kg, 소염효과 측정을 위한 크로톤 오일 유도성 귀부종법 측정시 ED₃₀는 0.3 mg/Kg이하였다. 또한, 급성 독성 시험시 LD₂₀는 2.0 g/Kg로 측정되었다. 이러한 약효시험과 급성독성 시험시 모든 약물은 정맥주사하였다. 국소 독성 시험시 150 mg/Kg에서도 독성을 발현하지 않아 일반적인 상용량 이상에서도 안전하므로 주사제의 모든 투여 경로에서 사용할 수 있다.

17> 종래에 비해 소염, 진통 약효가 매우 우수하고, 용해도, 급성 독성, 혈액 안전성 등에서도 가장 적합한 상기 인동등으로부터 얻은 유효활성성분 조성물 이외에도 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 용해보조제 등을 사용하여 주사제로 사용할 수 있다.

- 18> 상기 유효활성성분의 유효 투입량은 환자의 나이, 신체적 조건, 몸무게 등에 의해 다양화될 수 있지만, 일반적으로 5 ~ 100 mg/kg (몸무게)/1일 범위 내에서 투여한다. 그리고, 1일 유효 투여량 범위 내에서 하루에 한번 또는 하루에 여러 번 나누어 투여한다.
- 19> 이하, 본 발명은 다음 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는바, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- 20> 실시예 1: 인동 사용부위별 약효
- 21> 1999년 7월에 경북 영천에서 인동전초, 인동잎, 인동등 각각의 시료를 채취하여 음건하고 생약 중량 대비 7배량의 증류수로 2.5시간동안 환류 추출한 후 여과하여 여액을 모으고, 다시 7배량의 증류수로 2.5시간동안 환류 추출한 후 모은 액을 여과하여 앞의 여액과 합친 뒤 감압농축하여 그 부피가 원 생약 중량 대비 2배량(v/w) 정도가 되도록 한 후 다시 한번 여과하였다. 그런 다음 동량의 수포화 노말-부틸알코올을 넣어 15분간 30 rpm정도로 교반하고 2회 층분리를 한 뒤 알코올층을 여과, 감압 농축하여 1차 활성분획을 얻었다. 상기 정제분획에 대해 폴리아미드 레진(CAS NO. 63428-83-1)으로 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 상기 레진의 양은 시료 양의 5배량을 사용하였고 용매는 증류수, 50%(v/v) 메탄올 수용액, 메탄올 순서로 층진제 부피의 2 배량을 용출시켜 얻은 2차 활성분획을 다음 시험에 사용하였다. 크로톤 오일 유도성 귀부종법(Croton oil induced ear edema test)은 실험 실시 4시간 전에 절식시킨 6주령 ICR 마우스(body weight : 20 ~ 30 g , n=6, SLC, Japan)에 대해 꼬리 정맥을 통해 상기 인동전초, 인동등, 인동잎 2차 활성분획물을 투여하고 15분 후 2.5% 크로톤 오일

(croton oil)로 발염시킨 뒤 4시간 후에 두께측정기(dial thickness gauge)를 사용하여 왼쪽 귀와 오른쪽 귀의 두께를 각각 측정하여 다음 수학적 식 1에 의해 발염율을 계산하였고, 다음 표 1에 약효를 나타내었다.

22> 발염율(%) =
$$\frac{\text{발염된 귀(오른쪽)의 두께} - \text{정상귀(왼쪽)의 두께}}{\text{정상귀의 두께}} \times 100$$

【수학적 식 1】

23> 【표 1】

구 분	농도(mg/kg)	억제율(%)
인동전초	1	27.6
	3	31.7
	10	34.8
	25	33.6
	50	32.2
	100	30.4
인동등	3	30.2
	30	39.0
인동잎	3	19.6
	30	21.9

24> 상기 표 1에 나타내 바와 같이, 인동등 활성분획이 정맥 주사시 소염 및 진통 활성이 가장 우수하였다.

25> 실시예 2 : 인동등으로부터 얻은 활성분획 약효 비교

26> 크로톤 오일 유도성 귀 부종법은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.

27> 또한, 아라키돈산 유도성 귀 부종법(Arachidonic acid induced ear edema test)은 실험 실시 4시간 전에 절식시킨 6주령 ICR 마우스(body weight : 20 ~ 30 g, n=6, SLC, Japan)에

대해 꼬리 정맥을 통해 약물(마로비엔, 인동등의 1차 활성분획, 2차 활성분획)을 투여하고 15분 후 0.05% 아라키돈산으로 발염시킨 뒤 1시간 후에 두께측정기를 사용하여 왼쪽 귀와 오른쪽 귀의 두께를 각각 측정하여 상기 수학적 1로 계산한 후 억제율을 다음 표 2에 나타내었다.

28> 【표 2】

구분	투여량(mg/kg)	억제율(%)	
		CO*	AA**
대조군 (마로비엔)	50	21.0	NT
	100	25.8	NT
	200	30.1	NT
1차 활성분획	50	35.6	NT
	100	36.2	NT
	200	38.0	NT
2차 활성분획	0.1	19.8	11.7
	0.3	35.2	16.5
	3	38.0	26.3
	10	36.6	32.4
	30	37.1	48.7
*: 크로톤 오일 유도성 귀 부종법으로 실험한 결과 **:아라키돈산 유도성 귀 부종법으로 실험한 결과 NT: not-tested			

29> 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 인동등으로부터 얻은 2차 활성분획물은 방향족 유기산, 탄닌, 플라보노이드류 화합물들이 제거되었을뿐 아니라 유효활성 성분의 함량 또한 증가되어 1차 정제물과 비교하였을때에 뛰어난 개선효과를 가짐을 확인하였다.

30> 실시예 3 : 인동등으로부터 얻은 활성분획 약효 비교

- 31> 상기 실시예 1에서 폴리아미드 레진을 폴리비닐피롤리돈 레진(CAS NO. 25249-54-1)으로 대체하여 실험하였으며 그 과정 및 실험방법은 상기 실시예 1과 동일하다.

32> 【표 3】

구분	투여량(mg/kg)	억제율(%)	
		CO*	AA**
대조군 (마로비엔)	50	20.2	NT
	100	24.1	NT
	200	31.2	NT
1차 활성분획	50	33.2	NT
	100	35.1	NT
	200	37.5	NT
2차 활성분획	0.1	20.1	10.3
	0.3	34.1	16.7
	3	39.7	24.9
	10	35.6	33.3
	30	36.4	49.6
*: 크로톤 오일 유도성 귀 부종법으로 실험한 결과 **: 아라키돈산 유도성 귀 부종법으로 실험한 결과 NT: not-tested			

33> 실시예 4: 최종 정제물 제조 및 이에 대한 약효 시험

- 34> 상기 실시예 1에서 인동등 2차 활성분획물을 감압 농축한 후 얻은 분말에 대하여 다시 ODS 레진(YMC*GEL ODS-A 12nm, S-150 m 또는 ODS-AM 12nm, S-50 m 또는 ODS-AQ 12nm, S-50 m)을 이용해 컬럼크로마토그래피를 실시하는데 레진의 3배량의 20%(v/v) 메탄올 수용액을 용출시킨 최종 정제물을 다음 실험에 사용하였다.

- 35> 크로톤 오일 유도성 귀 부종법은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.

36> 또한, 아세트산 유도성 라이딩법(Acetic acid induced writhing test)은 실험 실시 전날에 절식시킨 ICR 마우스(body weight : 20~30g , n=8, SLC, Japan)에 대해 꼬리 정맥을 통해 약물(마로비벤, 인동등 최종 정제물)을 투여하고 20분 후 0.7% 아세트산을 복강 주사한 뒤 15분 후에 10분간의 라이딩(writhing) 횟수를 측정하여 염증 억제율을 다음 표 4에 나타내었다.

37> 【표 4】

구 분	용량(mg/kg)	억제율(%)	
		CO*	AA**
대조군(마로비벤)	1	6.6	37.9
	10	24.0	48.8
	100	29.8	56.5
최종 정제물	0.1	29.6	62.1
	1	34.8	68.4
	10	45.8	76.9
*: 크로톤 오일 유도성 귀 부종법으로 실험한 결과			
**: 아세트산 유도성 라이딩법으로 실험한 결과			

38> 실시예 5 : 유효활성성분의 함량 및 약효 시험

39> 상기 실시예 1과 4의 방법으로 제조된 다양한 시료의 최종 정제물에 대해 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 실시한 결과 유효활성 성분인 스웨로사이드(sweroside)가 15.1 ~ 72.1 중량%, 로가닌(loganin)이 13.9 ~ 41.4 중량% 함유되어 있음을 확인하였다. 스웨로사이드(sweroside)와 로가닌(loganin)의 함량은 시료의 산지와 시기별로 표 5와 같은 함량 분포를 나타내었고 각 시료의 최종정제물에 대한 약효는 다음 표 6에 나타내었다.

<40> 【표 5】

산지, 시기별 스웨로사이드(sweroside)와 로가닌(loganin)의 함량 변화

월	경북 영천	경북 안동	중국 태산	중국 신항
1	Lo : 34.6 Sw : 57.7 Total : 92.3	Lo : 38.3 Sw : 55.4 Total : 93.7	Lo : 38.2 Sw : 48.6 Total : 86.8	Lo : 31.4 Sw : 59.2 Total : 90.6
2	Lo : 30.2 Sw : 64.1 Total : 94.3	Lo : 32.3 Sw : 62.1 Total : 94.4	Lo : 33.3 Sw : 54.2 Total : 87.5	Lo : 28.6 Sw : 63.3 Total : 91.9
3	Lo : 22.7 Sw : 70.2 Total : 92.9	Lo : 26.1 Sw : 67.6 Total : 93.7	Lo : 25.8 Sw : 60.3 Total : 86.1	Lo : 20.5 Sw : 72.1 Total : 92.6
4	Lo : 13.9 Sw : 63.1 Total : 77.0	Lo : 15.9 Sw : 60.1 Total : 76.0	Lo : 19.1 Sw : 65.3 Total : 84.4	Lo : 14.2 Sw : 69.7 Total : 83.9
5	Lo : 17.1 Sw : 52.3 Total : 69.4	Lo : 14.2 Sw : 55.7 Total : 69.9	Lo : 18.7 Sw : 66.2 Total : 84.9	Lo : 14.9 Sw : 55.2 Total : 70.1
6	Lo : 19.4 Sw : 33.4 Total : 52.8	Lo : 16.2 Sw : 38.2 Total : 54.4	Lo : 23.5 Sw : 43.5 Total : 67.0	Lo : 17.4 Sw : 42.6 Total : 60.0
7	Lo : 21.7 Sw : 15.1 Total : 36.8	Lo : 25.3 Sw : 17.5 Total : 42.8	Lo : 28.9 Sw : 29.8 Total : 58.7	Lo : 22.4 Sw : 35.2 Total : 57.6
8	Lo : 23.5 Sw : 29.4 Total : 52.9	Lo : 27.0 Sw : 32.7 Total : 59.7	Lo : 30.1 Sw : 35.9 Total : 66.0	Lo : 32.1 Sw : 36.4 Total : 68.5
9	Lo : 25.3 Sw : 47.6 Total : 72.9	Lo : 30.1 Sw : 45.3 Total : 75.4	Lo : 33.6 Sw : 42.5 Total : 76.1	Lo : 39.2 Sw : 40.2 Total : 79.4
10	Lo : 28.7 Sw : 52.2 Total : 80.9	Lo : 32.2 Sw : 50.5 Total : 82.7	Lo : 33.8 Sw : 48.2 Total : 82.0	Lo : 37.4 Sw : 43.3 Total : 80.7
11	Lo : 39.6 Sw : 54.3 Total : 93.9	Lo : 37.3 Sw : 58.3 Total : 95.6	Lo : 38.0 Sw : 54.6 Total : 92.6	Lo : 41.4 Sw : 45.6 Total : 87.0
12	Lo : 36.2 Sw : 56.8 Total : 93.0	Lo : 33.7 Sw : 60.2 Total : 93.9	Lo : 35.2 Sw : 58.3 Total : 93.5	Lo : 40.2 Sw : 52.6 Total : 92.8

Lo : Loganin, Sw : Sweroside

<41>

【표 6】

최종정제물의 유효활성 성분의 함량별 약효

구분	용량 (mg/Kg)	억제율 (%)	
		CO*	AA**
대조군 (마로비넨)	10	25.6	46.9
	100	28.8	56.8
경북영천 7월 Lo:21.7, Sw:15.1 Total : 36.8	1	37.2	70.2
	10	46.3	75.1
경북안동 7월 Lo : 25.3, Sw : 17.5 Total : 42.8	1	40.3	72.2
	10	51.2	84.3
중국신항 7월 Lo : 22.4, Sw : 35.2 Total : 57.6	1	49.8	78.8
	10	52.6	85.6
중국태산 9월 Lo : 33.6, Sw : 42.5 Total : 76.1	1	52.1	82.9
	10	52.4	85.5
경북안동 11월 Lo : 37.3, Sw : 58.3 Total : 95.6	1	53.4	84.6
	10	53.2	87.7

*: 크로톤 오일 유도성 귀 부종법으로 실험한 결과

**: 아세트산 유도성 라이딩법으로 실험한 결과

<42> 실시예 6 : 최종 정제물에 대한 용혈시험

<43> 헤파린(Heparin)으로 처리한 주사기로 토끼 심장에서부터 혈액 20 ml를 채취하고 이를 약 10분간 원심분리하였다. 상층을 충분히 버리고 잔사를 주사용 생리식염수로 10배 희석하고 조심스럽게 흔들어 섞은 뒤 실시예 1의 각 농도의 약물(인동등의 최종 정제물 및 인동등, 인동잎, 인동전초의 1차 정제물) 및 실시예 4의 최종정제물의 농도별 용액 0.5 ml와 희석된 혈액 0.5 ml를 시험관에 넣어 준비하였다(식염수 대조군과 증류수(100 % 용혈) 대조군도 준비). 그 후 37 ℃ 항온조에서 15분간 방치하고 다시 45분간 실온에서 방치하였다. 마지막으로 2500 rpm에서 2분간 원심분리한 뒤 상층액을 540 nm에서 측정하였다.

<44> 【표 7】

구 분	용혈(%)	표준편차
대조군(주사용 생리식염수)	0.73	0.17
최종정제물 5×10^{-4} g/ml	0.69	0.10
최종정제물 1.5×10^{-3} g/ml	0.73	0.11
최종정제물 5×10^{-3} g/ml	0.74	0.88
인동등 5×10^{-3} g/ml	15.2	0.20
인동잎 5×10^{-3} g/ml	35.1	0.15
인동전초 5×10^{-3} g/ml	23.0	0.45

<45> 실시예 7 : 독성시험

<46> 실험 실시 4시간 전에 절식시킨 SD 래트(body weight : 120 ~ 170 g, 단위 용량 당 암수 각각 5마리, SLC, Japan)에 대해 꼬리 정맥을 통해 실시예 3의 최종 정제물을 1.0 g/Kg, 1.5 g/Kg, 2.0 g/Kg 단위로 투여하고 30분간 육안으로 관찰한 뒤 30분 간격으로 육안 관찰하였

다. 또한, 약물 투여 후 2주간의 사망률 관찰, 일반증상 관찰, 체중측정을 하였고 부검하여 각 장기의 이상 유무를 확인하였다.

<47> 최종 정제물의 LD₅₀은 2.0 g/Kg 이상으로 나타났으며(LD₂₀ = 2.0 g/Kg) 2.0 g/Kg의 용량에서 투여 후 약 10분간 호흡 증가 및 활동력 감소가 나타났으나 곧 회복되었고 다른 증상은 보이지 않았으며 체중 변화 또한 시험 물질의 투여에 의한 증감은 나타나지 않았다. 부검 결과 역시 대조군과 변화가 없었다.

<48> 50, 100, 150 mg/Kg의 용량으로 국소 독성 실험시에도 주사용 생리식염수 투여군과의 차이는 발견할 수 없었고 조직괴사나 염증반응 등의 독성 또한 보이지 않았다.

<49> 제조예 1: 주사제의 제조

<50> 상기 실시예 4에서 얻은 최종 정제물을 이용하여 다음과 같은 조성으로 주사제를 제조하였다.

<51> 주사용앰플 : 인동등 최종정제물 20 mg

<52> 만니톨 60 mg

<53> 대응하는 용매샘플 : 주사용 생리식염수 2000 mg

<54> 총 2080 mg

<55> 제조예 2 : 주사제의 제조

<56> 상기 실시예 4에서 얻은 최종 정제물을 이용하여 다음과 같은 조성으로 주사제를 제조하였다.

<57>	주사용앰플 : 인동등 최종정제물	50 mg
<58>	$\text{KH}_2(\text{PO}_4)$	8.5 mg
<59>	주사용 생리식염수	3000 mg
<60>	총	3058.5 mg

<61> 제조예 3 : 주사제의 제조

<62> 상기 실시예 4에서 얻은 최종 정제물을 이용하여 다음과 같은 조성으로 주사제를 제조하였다.

<63>	주사용앰플 : 인동등 최종정제물	100 mg
<64>	만니톨	300 mg
<65>	$\text{KH}_2(\text{PO}_4)$	17 mg
<66>	주사용 생리식염수	3000 mg
<67>	총	3417 mg

【발명의 효과】

<68> 이상에서 설명한 바와 같이, 상기 추출, 정제방법에 의해 인동등으로부터 얻은 활성분획물은 일반 추출, 정제물 대비 용해도 및 혈액안전성이 월등히 증가하였으며 진통, 소염 약효 또한 매우 우수하게 나타나 안전성, 안정성이 뛰어난 주사제의 원료로 적합하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

인동등을 물로 환류 추출한 후에 여과하고, 이 여액에 동량의 수포화 저급 알코올을 넣어 층 분리한 후 수포화 저급 알코올층을 감압농축하여 분말 엑기스를 얻고, 이 엑기스에 폴리아미드 레진 또는 폴리비닐피롤리돈 레진으로 정제 후 옥타데실실란 레진을 사용하여 정제하는 것을 특징으로 하는 인동등으로부터 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 수포화 저급 알코올은 부틸알콜 또는 프로필알콜의 포화수용액인 것을 특징으로 하는 인동등으로부터 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 유효활성성분은 스웨로사이드(sweroside)와 로가닌(loganin)임을 특징으로 하는 인동등으로부터 유효활성성분을 추출, 정제하는 방법.

【청구항 4】

스웨로사이드(sweroside)와 로가닌(loganin)이 유효활성성분으로 함유된 것을 특징으로 하는 진통, 소염 주사제 조성물.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 스웨로사이드(sweroside)는 15.1 ~ 72.1 중량%, 상기 로가닌(loganin)은 13.9 ~ 41.4 중량%이 함유된 것임을 특징으로 하는 진통, 소염 주사제 조성물.

【도면】

【도 1】

